

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-243960

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月14日

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

A 6 1 K 38/00

A B F

A 6 1 K 48/00

A D Z

A D U

C 0 7 K 14/47

A D Y

16/18

48/00

A D Z

G 0 1 N 33/15

Z

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平10-54928

(22) 出願日

平成10年(1998) 3月6日

(71) 出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72) 発明者 北浦 基次

大阪府豊中市服部豊町2丁目12-21

(72) 発明者 今井 俊夫

京都府京都市上京区西堀川通元誓願寺上ル
堅門前町414-502

(72) 発明者 義江 修

兵庫県西宮市北六甲台5丁目22-17

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

(54) 【発明の名称】 ヒトCC型ケモカインエオタキシン3

(57) 【要約】

【課題】 新規なヒトCC型ケモカインエオタキシン3とそれをコードするポリヌクレオチド分子を提供する。

【解決手段】 エオタキシン3タンパク質、エオタキシン3タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子、エオタキシン3タンパク質に対する抗体、およびエオタキシン3タンパク質とGタンパク質共役7回膜貫通型レセプター-CCR3の結合による生物作用に対するアゴニストあるいはアンタゴニストは、炎症、免疫、感染、癌などの治療および診断に有用な手段を提供することによって、該課題を解決することができる。

AL2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ケモカインレセプターCCR3のリガンドであるヒトCC型ケモカインもしくはその変異体またはそれらの断片であるタンパク質であって、CCR1、CCR2b、CCR4およびCCR5に対してリガンド結合阻害作用を有するタンパク質。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸残基1または24から94のアミノ酸配列を有するヒトCC型ケモカイン、またはこの配列に1または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加の中から選ばれる少なくとも1つの変異を含む配列を有し、かつ該ヒトCC型ケモカインの機能または活性と実質的に同じ程度である機能または活性を有する該ヒト型CCケモカインの変異体あるいは該ヒトCC型ケモカインのアンタゴニストとして機能する該ヒトCC型ケモカインの変異体、またはそれらの断片である請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】 請求項1または2記載のタンパク質を含有する医薬組成物。

【請求項4】 請求項1または2記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項5】 単クローン抗体である請求項4記載の抗体。

【請求項6】 請求項5記載の単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項7】 請求項1または2記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子。

【請求項8】 配列番号1の28位のAから309位のGまでの塩基配列の全長またはその部分に対応する請求項7記載のポリヌクレオチド分子、またはその塩基置換、塩基付加もしくはアレル変異による変異体。

【請求項9】 DNA分子またはRNA分子である請求項8記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項10】 請求項7から9までのいずれかに記載のポリヌクレオチド分子またはその塩基置換、塩基付加もしくはアレル変異による変異体を含有する医薬組成物。

【請求項11】 配列番号1の1位のCから467位のTまでの塩基配列の一部と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド分子、またはその塩基置換、塩基付加、アレル変異による変異体であって請求項1または2記載のタンパク質の活性または機能を阻害する分子。

【請求項12】 請求項7から9までのいずれかに記載のポリヌクレオチド分子を含有するベクター。

【請求項13】 請求項12に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項14】 請求項13に記載の形質転換体を培養し、産生されたタンパク質を培養物から回収することを特徴とする、請求項1または2記載のタンパク質を製造する方法。

【請求項15】 請求項1または2記載のタンパク質と

CCR3との結合による作用に対するアゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニストを含むと推定される試料を該タンパク質とCCR3との結合反応系に加えてその結合阻止を測定し、あるいはCCR3と直接反応させて、そのレセプターに対する結合性および/または反応性を測定する工程を包含する、該アゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする方法。

【請求項16】 請求項15記載のスクリーニング方法によって得ることのできる、請求項1から3までのいずれかに記載のタンパク質とCCR3との結合による作用に対するアゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は一般に、遺伝子発現およびタンパク質工学の分野に属し、具体的には新規なCC型ケモカインの遺伝子発現およびその関連技術並びにその医薬への応用に関する。

【0002】

【従来の技術】物理的、化学的あるいは生物学的な機序により起こる外来性あるいは内因性のさまざまな組織傷害、侵襲、抗原暴露などは強い炎症反応や免疫反応を誘導する。これらの反応は重要な生体防御反応であるが、ときには急性あるいは慢性的疾患の原因ともなりうる。炎症反応や免疫反応を誘発する原因が組織に加えられると、まず好中球、顆粒球、リンパ球あるいはマクロファージなどのような炎症性細胞あるいは免疫担当細胞の血管内皮細胞への吸着、血管外への移動、そして侵襲あるいは障害された組織や抗原の存在する組織での集積が起こる。このような一連の細胞遊走反応を誘導する物質として一群のケモタクティック・サイトカイン、いわゆるケモカインが存在する。ケモカインは遊走反応(ケモタクティック反応)を誘導する一群のサイトカインであり、アミノ酸配列の類似性から構造的にも相互に密接に関係する。これまでにヒトでは少なくとも35種のケモカインが報告されている。ケモカインは共通に保存された3個ないし4個のシステイン残基のうちの最初の2個の並び方から、大きくC型、CXC型(2個のシステインが1個のアミノ酸で隔てられている)とCC型(2個のシステインが隣り合っている)、CXXX型(2個のシステインが3個のアミノ酸で隔てられている)に分けられる。C型ケモカインとしてヒトではSCM-1が、CXXX型ケモカインとしてヒトではFractalkineが知られている。CXC型ケモカインとしてはヒトではIL-8、 β -TG、PF-4、MGSA/GRO、ENA-78、NAP-2、GCP-1、GCP-2、IP-10、SDF-1/PBSF、MIGなどが知られ、主に好中球の活性化と遊走を誘導する。CC型ケモカインとしてはヒトではMIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、I-309、エオタキシン、ELC、LARC、SLC、PARC、TARC、MDC、MPIF-1、MPIF

-2(エオタキシン2)、TECK、HCC-1、HCC-2などが知られ、主にモノサイト/マクロファージの活性化と遊走を誘導する。また、CC型ケモカインにはT細胞、好塩基球、好酸球などに対して活性化と遊走誘導を示すものが知られている (Oppenheim et al., Annu. Rev. Immunol. 9: 617-648, 1991; Baggiolini et al., Adv. Immunol. 55: 97-179, 1994; Ben-Baruch et al., J. Biol. Chem. 270: 11703-11706, 1995)。

【0003】エオタキシンとは好酸球を遊走させる活性を示す、CCR3をレセプターとするケモカインに付された名称であり、ヒトエオタキシンのアミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列は1997年1月9日発行のW09700960に開示されている。次いで、Vikram P. Paterl. et al., (1997), J. Exp. Med. vol. 185: 1163-1172およびUlrich Forssmann et al., (1997) J. Exp. Med. Vol. 185: 2171-2176には、エオタキシン2 (MPIF-2) が開示されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、新たなCC型ケモカインを見出すべく、ワシントン大学(Washington University)のGenome Sequencing Centerが公開しているヒトゲノムシーケンスデータからゲノムDNA解析プログラムGRAILを用いてタンパク質コード領域を検索した。その結果、新たなCC型ケモカイン様タンパク質をコードすると考えられる配列の存在を見出し、ヒト肺組織由来mRNAからcDNAを単離し、その全長にわたる塩基配列を決定した。そして、遺伝子工学的技術を用いて産生したタンパク質は、ヒトCCR3発現細胞に対して細胞内カルシウム濃度を上昇させる活性を示すことを明らかにし、これが好酸球、好塩基球、TH2タイプのT細胞上に発現しているGタンパク質共役7回膜貫通型タンパク質ケモカインレセプターCCR3 (Kitaura et al., J. Biol. Chem. 271: 7725-7730, 1996) に特異的に反応するリガンドであることを見出し、本発明を完成するに至った。そしてこの新規のヒトCC型ケモカインをエオタキシン3 (eotaxin3) と命名した。本発明エオタキシン3とエオタキシンとの相同性は31%、エオタキシン2との相同性は32%である。

【0005】エオタキシン3はcDNAの塩基配列から予想されるオープンリーディングフレーム (open reading frame, ORF) から94個のアミノ酸からなるタンパク質と推定され、さらに成熟型タンパク質では23番目のアラニンと24番目のスレオニンとの間でシグナル配列が切断され、71個のアミノ酸からなる分子量約8.4kDaの塩基性タンパク質であると推定される。成熟型のエオタキシン3は既知のCC型ケモカインと有意の相同性を示し、特にCC型ケモカインで保存されている4個のシステインはすべて保存されている。しかし、既存のCCケモカインとの相同性は最も高いMIP-1βに対しても36%程度である。エオタキシン3は、好酸球、好塩基球、TH2

タイプのT細胞に発現して喘息、アトピー等のアレルギー、HIVの感染メカニズムに関係していると考えられているGタンパク質共役7回膜貫通型タンパク質のケモカインレセプターであるCCR3 (Kitaura et al., J. Biol. Chem. 271: 7725-7730, 1996) と特異的に反応するという特徴から、アレルギー発症メカニズムの解明およびHIVの感染メカニズムの解明に重要である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、ケモカインレセプターCCR3のリガンドであるヒトCC型ケモカインもしくはその変異体またはそれらの断片であるタンパク質であって、CCR1、CCR2b、CCR4およびCCR5に対してリガンド結合阻害作用を有するタンパク質、好ましくは配列番号1のアミノ酸残基1あるいは24から94のアミノ酸配列を有するヒトCC型ケモカイン、その変異体またはそれらの断片であるタンパク質；本発明タンパク質を含有する医薬組成物、好ましくは抗炎症剤、免疫応答調節剤、抗感染症剤、抗癌剤、炎症及び/又は免疫に関連する病気の診断薬；本発明タンパク質に対する抗体、好ましくは単クローン抗体；本発明単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

【0007】本発明タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子、好ましくは配列番号1の28位のAから309位のGまでの塩基配列の全長あるいは部分に対応するポリヌクレオチド分子、またはその変異体、より好ましくはDNA分子またはRNA分子であるポリヌクレオチド分子；配列番号1の1位のCから467位のTまでの塩基配列の一部と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド分子、またはその変異体であって本発明タンパク質の活性または機能を阻害する分子；

【0008】本発明ポリヌクレオチド分子を含有するベクター；本発明ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体；本発明形質転換体を培養し、産生されたタンパク質を培養物から回収することの特徴とする、本発明タンパク質を製造する方法；本発明ポリヌクレオチド分子またはその変異体を含有する医薬組成物；本発明タンパク質とCCR3との結合による作用に対するアゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、レセプターに対する結合性および/または反応性を測定する工程を包含する方法；および本発明スクリーニング方法によって得ることのできる、本発明タンパク質とCCR3との結合による作用に対するアゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニスト、に関する。

【0009】本発明の1つの発明は、ケモカインレセプターCCR3のリガンドであるヒトCC型ケモカインもしくはその変異体またはそれらの断片であるタンパク質であって、CCR1、CCR2b、CCR4およびCCR5に対してリガンド結合阻害作用を有するタンパク質に関する。CCR1はMIP-1α、RANTESのレセプターとし

てNeote, K. et.al. (1993) Cell 72, 415-425に記載されている。CCR2bはMCP-1、MCP-3のレセプターとしてCombadiere, C., et.al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 29671-29675に記載されている。CCR4はTARC、MDCのレセプターとしてImai, T., et.al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 1764-1768に記載されている。CCR5はMIP-12、MIP-1 β 、RANTESのレセプターとしてCombadiere, C., et.al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 16491-16494に記載されている。「リガンド結合阻害作用」とは、各レセプターのリガンドとしての機能は示さないが、本来のリガンドと各レセプターとの結合を阻害する作用を意味する

【0010】別の態様では、本発明は、配列番号1のアミノ酸残基1または24から94のアミノ酸配列を有するヒトCC型ケモカイン（エオタキシン3前駆体またはエオタキシン3）、またはこの配列に1または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加の中から選ばれる少なくとも1つの変異を含む配列を有し、かつ該ヒトCC型ケモカインの機能または活性と実質的に同じ程度である機能または活性を有する該ヒトCC型ケモカインの変異体、あるいは該ヒトCC型ケモカインに対するアンタゴニストとして機能する該ヒトCC型ケモカインの変異体、またはそれらの断片であるタンパク質に関する。

【0011】本明細書中、「CC型ケモカインエオタキシン3の変異体」とはエオタキシン3タンパク質のアミノ酸配列に1または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加の中から選ばれる少なくとも1つの変異を含む配列を有し、および／あるいは化学的または生化学的な改変または天然もしくは非天然のアミノ酸を含むことのできる改変タンパク質で、機能または活性が実質的に該CC型ケモカインと同じであるタンパク質あるいは該CC型ケモカインのアンタゴニストとして機能するタンパク質、を意味する。本明細書中、「CC型ケモカインエオタキシン3またはその変異体の断片」とは特に規定されず、短くてもエオタキシン3の活性に影響しない長さのタンパク質を意味する。

【0012】別の態様として、本発明は、本発明のCC型ケモカインおよび該タンパク質の変異体をコードするポリヌクレオチド分子に関する。好ましくは、配列番号1の塩基配列の28位のAから309位のGまでの塩基配列の全長あるいは部分に対応するポリヌクレオチド分子、またはその塩基置換、塩基付加もしくはアレル変異による変異体である。本明細書中、「ポリヌクレオチド分子」はDNAでもRNA分子でもあり得る。DNAの場合、cDNA、ゲノミックDNAあるいは合成DNAであり得る。またDNAおよびRNAいずれも2本鎖でも1本鎖でもあり得る。1本鎖の場合コード鎖あるいは非コード鎖であり得る。「本発明のポリヌクレオチド分子の塩基置換、塩基付加による変異体」とは、配列番号1に記載された塩基配列とは異なる遺伝子コードを用いて、結果的には配列番号1に記載されたアミノ酸1から94のタンパク質と同じタンパク

質、あるいは配列番号1に記載されたアミノ酸配列24から94のタンパク質と同じタンパク質、をコードする変異体を意味する。「アレル変異による変異体」とは自然に存在する個人差や人種差に基づく塩基変異を意味し、コードするアミノ酸配列が変化する場合もある。また、本発明のポリヌクレオチド分子は配列番号1の塩基配列の97位のAから309位のGからなる塩基配列の全長あるいは一部であり得る。一部の塩基配列の場合、通常その長さは本発明タンパク質の断片をコードする長さである。

【0013】本発明は別の態様として、配列番号1の1位のCから467位のTまでの塩基配列の一部と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド分子、またはその塩基置換、塩基付加、アレル変異による変異体であって本発明タンパク質の活性または機能を阻害する分子に関する。特に、5'ノンコーディング部分の相補的な配列が好ましいが、より好ましくは転写開始部位、翻訳開始部位、5'非翻訳領域、エクソンとイントロンとの境界領域もしくは5'CAP領域に相補的な配列であることが望ましい。好ましい長さは、約10塩基対(bp)～約40bpである。

【0014】また、別の態様として、本発明は本発明のポリヌクレオチド分子を含有するベクターに関する。本発明ベクターには発現ベクター、クローニングベクター、治療用ベクターなどの種々の用途を持つベクターが包含される。発現ベクターは本発明タンパク質の大量生産に利用できる。発現ベクターについての詳細は以下の発明の実施形態の項に示す。治療用ベクターは本発明ポリヌクレオチド分子を投与し細胞内に導入する手法に用い、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献(等)のいずれの手法も適用することができる。ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス等のRNAウイルス等に本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。その他の方法としては、プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）リポソーム法、リポフェクティン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

【0015】さらなる態様として、本発明は本発明のタンパク質またはその変異体あるいはそれらをコードするポリヌクレオチド分子を含有する医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物には例えば、抗炎症剤、免疫応答調

10

20

30

40

50

節制、抗感染症剤、抗癌剤、炎症および／または免疫に関連する病気の予防薬または診断薬が包含される。本発明のポリヌクレオチド分子を医薬として作用させるには、直接体内に導入するin vivo方法、およびヒトからある種の細胞を採用し体外で遺伝子を該細胞に導入しその細胞を体内に戻すex vivo方法がある。本発明タンパク質またはポリヌクレオチド分子の投与量は、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常本発明タンパク質として、0.001mg〜100mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。なお、本発明のタンパク質は生体内活性物質であることから、該タンパク質の活性が生じる量、すなわち本発明のタンパク質を含む医薬組成物の使用量においてはその急性毒性は問題とならないことが容易に推測される。

【0016】さらに、本発明は本発明のタンパク質またはその変異体に対する抗体、特に単クローン抗体、および該単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞に関する。

【0017】別の態様として、本発明は、本発明のタンパク質とその特異的レセプターとの関係を提供することによって、本発明のタンパク質とその特異的レセプターとの結合により引き起こされる生物作用に対するアゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニストとして働く物質を探索し、評価する工程を包含する方法に関する。すなわち、該アゴニスト、インバースアゴニストまたはアンタゴニストを含むと推定される試料を該タンパク質とその特異的レセプターの結合反応に加えてその結合阻止を測定したり、該タンパク質に対する特異的レセプターへの直接の結合性および／または反応性を測定する工程を包含する方法に関する。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明はおもにどの組織においても低レベルで構成的に発現しているヒトCC型ケモカインに関する。次に本発明タンパク質の調製工程を説明する。本明細書において、特に指示のない限り、当該分野で公知である遺伝子組換え技術、動物細胞、昆虫細胞、酵母および大腸菌での組換えタンパク質の生産技術、発現したタンパク質の分離精製法、分析法および免疫学的手法が採用され得る。

【0019】本発明タンパク質の調製

本発明のエオタキシン3タンパク質をコードするDNAを含むDNA断片の配列決定方法を例示する。このDNA断片の配列は、例えばヒトの肺組織などから由来したcDNAから得ることができるが、そのためには、まずcDNAライブラリーからエオタキシン3タンパク質をコードするcDNAのクローニングを行うためのプライマーが必要である。

【0020】(1) ヒトゲノムシーケンスデータからのエオタキシン3 cDNA部分配列の検索

Washington UniversityのGenome Sequencing Centerが公開しているヒトゲノムシーケンスデータからゲノムDN

A解析プログラムGRAILを用いてタンパク質コード領域を検索し、CC型ケモカインと有意の 相同性をもつが、既知のケモカインとは異なるタンパク質をコードすると考えられるエキソン配列を見出す。得られたエキソン配列をもとにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用プライマー1対を合成する。

【0021】(2) エオタキシン3の全長cDNAの塩基配列の決定

つぎに、これらのプライマーを用いて、例えばヒト肺組織のmRNAから、cDNA末端迅速増幅法(rapid amplification of cDNA ends、RACE法) (Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 8998-9002, 1988) を利用し、cDNAの全長にわたる塩基配列を決定する。すなわちヒト肺組織より調製されたMarathon-Ready™ cDNA (Clontech社製)を用いて、5'側RACEと3'側RACEを行う。すなわち、まず上流側の5'側プライマーから下流の3'側へ向かってcDNAの3'端までcDNAを増幅し、得られたcDNA断片を適当な塩基配列決定用ベクター、例えばpGEM-T (Promega社製)やpBluescript II (Stratagene社製)に挿入する。次に組換えプラスミドを回収し、クローニングされたcDNA断片の塩基配列を、例えばSanger法 (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467, 1977) によって決定する。つぎに、同様に、下流の3'側プライマーから上流の5'側へ向かってcDNAの5'端までcDNAを増幅する。得られたcDNA断片を上記と同様に適当な塩基配列決定用ベクターに挿入し、組換えプラスミドを回収し、クローニングされたcDNAの塩基配列を決定する。このようにして決定した2種類のcDNAクローンの塩基配列を両方で共通する領域を用いて重ね合わせることによって、全長のcDNAに対応する塩基配列が決定される。

【0022】(3) エオタキシン3の全長cDNAの調製
得られたエオタキシン3の全長 cDNAの塩基配列をもとに、エオタキシン3タンパク質をコードする領域の両端の塩基配列にもとづいて合成した2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)により増幅し、適当な塩基配列決定用ベクター(上記)に挿入し、組換えベクターを回収して、クローニングされたcDNAの塩基配列を決定する(上記)。

40 【0023】(4) 組換えエオタキシン3の発現

つぎに得られたエオタキシン3タンパク質をコードするcDNAを適当な発現ベクターに組み込み、エオタキシン3タンパク質を発現するための発現ベクターとする。適当な発現ベクターとしては、例えば、細菌についてはpRSET、pGEMEX、pKK233-2、など、酵母についてはpYES2、昆虫細胞についてはpVL1393、動物細胞についてはpEF-BOS、pSRα、pDR2、などが各々挙げられる。この発現ベクターを適当な宿主細胞、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞に導入して、形質転換体を作製する。大腸菌などの原核微生物では、原核微生物の分泌タ

ンパク質に由来するシグナル配列（例えばシグナルペプチドOMPα）と成熟型エオタキシン3タンパク質とが融合した融合タンパク質として、強力なプロモーター（例えばT7プロモーター）の支配下に発現し得る。酵母では、酵母の分泌タンパク質の天然前駆物質に由来するシグナル配列（例えばフェロモンαのプレプロ配列）と成熟型エオタキシン3タンパク質とが融合した融合タンパク質として、発現し得る。動物細胞では、すでに存在するシグナル配列を含むエオタキシン3タンパク質の前駆体タンパク質の遺伝子を強力なプロモーター（例えばEF-1αプロモーター）の下流に挿入し、効果的な選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ）と共に動物細胞（例えばCHO dhfr⁻細胞）に導入し、薬剤（この場合はメトトレキセート）に対する耐性により細胞を選択し、高発現の細胞株を樹立し得る。またシグナル配列を含むエオタキシン3タンパク質前駆体の遺伝子をウイルスまたはレトロウイルスに組み込み、この組換えウイルスを動物細胞に感染にさせることにより、発現し得る。これら形質転換体を培養することにより、エオタキシン3タンパク質が産生分泌され得る。

【0024】あるいは、成熟型エオタキシン3タンパク質は、例えば固相法を用いて、2個のジスルフィド結合の存在に必要な注意を払って、報告された方法（Clark-Lewis et al., Biochemistry 30:3128-3135, 1991）をもちいて全合成される。得られたタンパク質の精製は当業者に周知の方法、例えば、アフィニティーカラム、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、などを組み合わせて行うことができる（Imai et al., J. Biol. Chem. 271: 21514-21521, 1996）。本発明のエオタキシン3タンパク質の変異体の発現は、当業者に周知の遺伝子組換え技術（Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory）によって変異を導入したDNAを用いて行うことができる。

【0025】本発明タンパク質に対する抗体の調製
本発明のエオタキシン3タンパク質に対する抗体は、例えば、推定されるエオタキシン3のアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチドや、エオタキシン3を発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、などにより産生されたエオタキシン3タンパク質を通常のタンパク化学的方法で精製し、これらを免疫原として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、などの動物を免疫して、その血清由来の抗体（ポリクローナル抗体）を作製する。

【0026】あるいは、免疫したマウスやラットの脾臓またはリンパ節からリンパ球を取りだし、ミエロマ細胞と融合させてKohlerとMilsteinの方法[Nature, 256, 495-497 (1975)]又はその改良法であるUedaらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4386-4390, 1982]に従っ

てハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマから単クローン抗体を産生させ得る。例えば以下の工程によりエオタキシン3タンパク質の単クローン抗体を得ることができる。

(a) エオタキシン3タンパク質によるマウスの免疫、(b) 免疫マウスの脾臓の除去及び脾臓細胞の分離、(c) 分離された脾臓細胞とマウスミエロマ細胞との融合促進剤（例えばポリエチレングリコール）の存在下での上記のKohlerらに記載の方法による融合、(d) 未融合ミエロマ細胞が成長しない選択培地での得られたハイブリドーマ細胞の培養、(e) 酵素結合免疫吸着検定（ELISA）、ウエスタンブロット、などの方法による所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選択及び限定希釈法等によるクローニング、(f) エオタキシン3単クローン抗体を産生するハイブリドーマ細胞を培養し、単クローン抗体を収穫する。

【0027】エオタキシン3タンパク質のmRNAとタンパク質の検出

本発明のエオタキシン3のmRNAとタンパク質の存在は、通常の特異的mRNAおよびタンパク質に対する検出法を用いて行うことができる（Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory 1989; Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory 1988）。例えば、mRNAはアンチセンスRNAやcDNAをプローブに用いたノーザンブロット解析やインサイツ・ハイブリダイゼーション法により検出できる。また、mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換したのち、適当なプライマーの組み合わせによるポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によっても検出することができる。タンパク質については、エオタキシン3タンパク質に特異的な抗体を用いた免疫沈降やウエスタンブロットなどにより検出することができる。

【0028】エオタキシン3タンパク質の免疫学的定量法

例えば、放射性アイソトープ、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼのような酵素、あるいは蛍光色素などで標識した一定量のエオタキシン3に、濃度既知の非標識エオタキシン3、および血清由来の抗エオタキシン3ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を加えて、抗原抗体競合反応を行わせる。非標識抗原の濃度を適当に変化させた後、抗体と結合した標識抗原と抗体に結合していない標識抗原とを適当な方法で分離して、抗体と結合した標識抗原の放射能、酵素活性または蛍光強度を測定する。非標識抗原量が増すにつれ、抗体と結合する標識抗原の量は減少する。この関係をグラフにして標準曲線を得る。またエオタキシン3タンパク質上の異なるエピトープを認識する2種類の単クローン抗体の一方を固相化し、他方を上記のいずれかの方法でラベルし、固相化抗体に結合したエオタキシン3の量をラベ

ル抗体で検出定量する、いわゆるサンドイッチ法も可能である。次に、上記の反応系に濃度既知の非標識抗原の代わりに未知量の抗原を含む試料を加え、これを反応させた後に得られる、放射能、酵素活性、または蛍光強度、を標準曲線にあてはめれば、試料中の抗原、すなわちエオタキシン3タンパク質の量を知ることができる。

エオタキシン3タンパク質を定量することにより、炎症反応や免疫反応をモニターするための新しい方法が提供され得る。

【0029】エオタキシン3タンパク質のケモカイン活性の測定

本発明のエオタキシン3タンパク質のケモカイン活性は、例えば、標的細胞にFura-2 AMやFura PE3を取り込ませ、エオタキシン3タンパク質を添加したときの細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光高度計で測定してエオタキシン3タンパク質の標的細胞の反応性を見る。また、例えば、試験管内では、一定の口径のボアを有するフィルターを介在させて仕切った培養容器の一方の側にエオタキシン3タンパク質を入れ、他方の側に標的細胞を入れて、一定時間後にフィルターのボアを通過してエオタキシン3タンパク質の存在する側へ移動した細胞数をランダムな移動数と比較して示し得る。また、生体内では、精製したエオタキシン3タンパク質を動物に投与して細胞の浸潤と集合を組織学的方法で検出することによって示し得る。

【0030】各種レセプターとの結合試験

CCR1、CCR2b、CCR3、CCR4およびCCR5の各種レセプターの遺伝子を発現する細胞は、例えば*

mc7.exon 1 F 5'-AAGGCCTGATTTGCAGCATC-3' (配列番号2)

nc7.ex3R 5'-AAAGATTCGCGAGGCTCCCCAGAGG-3' (配列番号3)

次に、ヒト肺組織由来のヒト肺組織のMarathon-Ready™ cDNA (CLONTECH社製)を鋳型として、AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems社製)を用いてPCRを行った。すなわち、cDNAを鋳型とし、各1μMのmc7.exon 1 Fプライマーとnc7.ex3Rプライマーおよび25 U/ml AmpliTaq Gold™、1x AmpliTaq Gold™添付緩衝液、0.2 mM dNTPsに加え、OmniGene (HYBAID社製)を用いてPCRを行った。反応は、95℃で9分間前処理した後、94℃で1分間、58℃で1分間、72℃で90秒の反応サイクルを40回、最後に72℃で5分間を1回行った。増幅されたDNA断片をアガロース電気泳動により分離し、臭化エチジウム法で染色※

MPIF-3.ex2F2 5'-CATATCCAAGACCTGCTGCTTCCAATACAGCC-3' (配列番号4)

nc7.ex2F 5'-TTCCCTGGACCTGGGTGCGAAGCTA-3' (配列番号5)

MPIF-3.ex3R2 5'-CTTCAGAAAAGATTCGCGAGGCTCCCCAGAG-3' (配列番号6)

nc7.ex3 XbaI 5'-GCTCTAGACAATTGTTTCGGAGTTTTCAGTAAAGAA-3' (配列番号7)

【0034】まず、5' RACE反応では、上記のcDNA 2μl にdNTPs (終濃度 0.2 mM)、AmpliTaq Gold™ (0.625 unit)、アダプター部に結合するAP1プライマー4 pmol e、およびMPIF-3.ex3R2プライマー (配列番号6) 4 pmol を加え、1x AmpliTaq Gold™ 緩衝液の反応液20μl

*ばT. Imai, et al.; J. Biol. Chem. Vol.273, 1764-1768に記載されている作製方法に従って作製できる。細胞としてはヒト赤白血球細胞株K 562細胞、マウスブレB細胞株L1. 2細胞などを利用すればよい。

【0031】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、本実施例は本発明を限定するものでない。

実施例1

エオタキシン3のcDNAの単離およびその構造決定

(1) ヒトゲノムシーケンスデータからのエオタキシン3 cDNA 部分配列の検索。

Washington UniversityのGenome Sequencing Centerが公開しているヒトゲノムシーケンスデータ中の塩基配列H_RG356E01からゲノムDNA解析ソフトGRAILを用いてタンパク質コード領域を検索し、CC型ケモカインと有意の相関性をもつが、既知のケモカインとは異なるケモカインタンパク質をコードすると考えられるエキソン配列を見出した。

【0032】(2) エオタキシン3 mRNA発現ヒト組織の確認

エオタキシン3 mRNAの検出は、エオタキシン3に特異的なプライマーの組み合わせによるポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を用いて行った。まず、Genome Sequencing Centerが公開しているヒトゲノムシーケンスデータ中の塩基配列H_RG356E01をもとにPCR用プライマー1対、mc7.exon 1 Fプライマーおよびnc7.ex3Rプライマーを合成した。mc7.exon 1 Fプライマーおよびnc7.ex3Rプライマーの配列はそれぞれつぎの通りである：

※した。エオタキシン3のcDNAに由来する約390bpのDNAが検出されたことから、ヒト肺組織がエオタキシン3 mRNAを発現することを確認した。

【0033】(3) エオタキシン3 cDNAの単離

まずヒト肺組織由来のヒト肺組織のMarathon-Ready™ cDNA (CLONTECH社製)を用いて5' RACE反応と3' RACE反応 (Frohman et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85 : 8998-9002, 1988)を行った。5' RACE反応と3' RACE反応用のプライマーをGenome Sequencing Centerが公開しているヒトゲノムシーケンスデータ中の塩基配列H_RG356E01をもとに合成した。

★中、94℃で5分の前処理後、直ちに94℃、1分間；68℃、2分間の条件で40サイクル後、72℃；5分処理するPCR反応を行った。また、3' RACE反応は、上記と同様の反応条件で、MPIF-3.ex3R2プライマーの代わりにMPIF-3.ex2F2プライマー (配列番号4) を用いて行った。反応後、

13

それぞれのPCR産物を鋳型にし、セカンドPCRを行った。5' RACE反応では、上記のPCR産物を50倍希釈したものを5 μ l、dNTPs (終濃度 0.2 mM)、AmpliTaQ Gold™ (1.25 unit)、アダプター部に結合するAP2プライマー 10 pmol、nc7.ex3 XbaIプライマー (配列番号7) 10 pmolを加え、1x AmpliTaQ Gold™ 緩衝液の反応液50 μ l中、94℃で5分の前処理後、直ちに94℃、1分間；60℃、1分間；72℃、1分間の条件で30サイクル後、72℃、5分処理するPCR反応を行った。また、3' RACE反応は、上記と同様の反応条件で、nc7.ex3 XbaIプライマーの代わりにnc7.ex2Fプライマー (配列番号5) を用いて行った。

【0035】PCR産物をフェノール抽出法を行い、それぞれエタノール沈殿の操作を行った後、3%低融点アガロースゲル電気泳動で分離し、おもな5' RACE断片 (約340bp) およびおもな3' RACE断片 (約390bp) をWizard PCR Preps DNA Purification System (Promega社製) を用いて回収した。それぞれのDNA水溶液の4.5 μ lをベクターpGEM-T Easy (Promega社製) 0.5 μ lと混合し、DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa社製) のI液を5 μ l加えて、16℃、30分反応後、大腸菌 DH5 α (TOYOBO社製) にトランスフォームし、形質転換体を得た。

(4) 陽性クローンの同定と塩基配列決定

上記工程で得られたコロニーの内の数個からプラスミドDNAを抽出し、SP6プロモーター・プライマーおよびT7プロモーター・プライマーを用いてcDNAの5' および3' 端側の塩基配列を調べた。5' RACE反応および3' RACE反応のそれぞれから得られたクローン (以下5'-RACE cDNAと3'-RACE cDNAと称す) から抽出したプラスミドをdRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製) を用いて反応し、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems社製) で塩基配列を決定した。そしてこのようにして得られた一部重複する2つのcDNA配列からエオタキシン3のcDNAの全長が決定された。その結果、最初に現れる翻訳開始コドンATGの規定するメチオニンを含む94個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードする塩基配列が存在することが判明した。このタンパク質のアミノ酸配列は既知のケモカインとは一致はしないが、有意の相同性を有し、またケモカインの構造的特徴である保存された4個のシステイン残基を含むこと、また分泌タンパク質の特徴であるN端側に疎水性に富むシグナル配列様の配列が存在すること、などから新規のケモカインと推定した。

【0036】(5) エオタキシン3の推定アミノ酸配列の解析

決定された全長cDNAの塩基配列および推定される開始コドンから始まる最長の翻訳枠 (open reading frame : ORF) のアミノ酸配列を図1に示す。この遺伝子は94個のアミノ酸よりなるORFを有し、N末端には分泌タンパク質に特徴的なシグナルペプチドと推定される約23個の疎

14

水性の強いアミノ酸配列を有する。この94個のアミノ酸からなるタンパク質の分子量は10.6 kDaであった。シグナルペプチド切断後の、71個のアミノ酸からなる、推定上の成熟型タンパク質は、分泌タンパク質であると推定され、その分子量は8.4 kDa、また等電点は10.9であった。アミノ酸配列の類似性解析は、ClustalWプログラムを用いて行った。その結果を図2及び図3に示す。得られたcDNA塩基配列のORFから推定されるタンパク質を含めてすべてのCC型ケモカインで保存されているアミノ酸は*印で示した。また得られたcDNA塩基配列のORFから推定されるタンパク質と他のCC型ケモカインとの相同性の程度を%表示で右側に示した。すなわち推定されるアミノ酸配列はCC型ケモカインに属する、例えば、エオタキシンと31%、エオタキシン2と32%、MCP-4と29%、MIP-1bと36%、RANTESと34%、MIP-1aと35%、MCP-3と31%の相同性があることが明らかとなった。また、全てのCCケモカインで保存されている、4つのシステインはエオタキシン3でも保存されていることが明らかとなった。従って、得られたアミノ酸配列は新規のヒトCC型ケモカインのものであると考えられる。

【0037】実施例2

PCR法によるエオタキシン3 mRNAの発現解析

Multiple Tissue cDNA PanelsのHuman MTC Panel IとII (CLONTECH社製) を鋳型として、AmpliTaQ Gold™ (Applied Biosystems社製) を用いてPCRを行った。すなわち、cDNAを鋳型とし、各0.2 μ Mのnc7.exon 1 Fプライマーとnc7.ex3Rプライマーおよび25 U/ml AmpliTaQ Gold™、1x AmpliTaQ Gold™添付緩衝液、0.2mM dNTPsに加え、DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer社製) を用いてPCRを行った。反応は、95℃で9分間前処理した後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分の反応サイクルを33回、最後に72℃で5分間を1回行った。増幅されたDNA断片をアガロース電気泳動により分離し、臭化エチジウム法で染色した。図4のAに示すとおり、エオタキシン3のcDNAに由来する約390bpのDNAがどの組織においても低レベルで検出された。

【0038】ノーザンブロット解析によるエオタキシン3 mRNAの発現解析

まず、エオタキシン3のプロンプを作るために、MPIF-3.ex2F2 (配列番号4) とMPIF-3.ex3R2 (配列番号6) のプライマーを用いてPCR法を行った。各種のヒト組織より単離したpoly(A)+RNA 2 μ gをアガロースゲル電気泳動にかけ、既にナイロン膜に転写した状態のもの (マルチプルティッシュブロット) をClontech社より購入し、マルチプライムDNA標識システム (Stratagene社製) により32Pで標識した上記のエオタキシン3遺伝子DNA断片をプローブとして、ハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション溶液はQuikHyb (Stratagene社製) にサケ精子DNA100 μ g/mlを加えたものを用い、65℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った。膜の洗浄

は2x SSC、0.1% SDSの緩衝液で15分を室温で2回、2xSSC、0.1% SDSの緩衝液で15分、65°Cで1回、0.1x SSC、0.1% SDSの緩衝液で1時間、65°Cで1回行った後X線フィルム(Kodak社製)に感光させ、それらを現像して解析した。各種のヒト組織でのエオタキシン3 mRNAの発現を図4のBに示す。図4のBの結果から、ノザンブロットではエオタキシン3のmRNAは、心臓と卵巣で発現していることが明らかとなった。

【0039】実施例3

組換えエオタキシン3タンパク質の調製

(1) 組換えエオタキシン3タンパク質の発現
エオタキシン3タンパク質をコードするcDNAを導入して昆虫細胞にエオタキシン3タンパク質を産生させた。エオタキシン3タンパク質発現用のベクターを構築する為にまず、エオタキシン3 cDNAのORFを単離した。実施例1の(2)で得られたPCR産物をベクターpCRTM 2.1 (invitrogen社製)に組み込んだ。このプラスミドを制限酵素BamHIとXhoIで分解し、大腸菌内でバキュロウイルスと組み換えをおこせるベクターpFAST-Bac (Gibco-BRL社製)のBamHIとXhoIサイトの間に挿入し、ベクターpFAST-Bac-エオタキシン3を作製した。このベクターを大腸菌(E. coli) DH10Bac (Gibco-BRL社製)に導入し、エオタキシン3タンパク質を発現する組み換えバキュロウイルスDNAを作製した。この組み換えバキュロウイルスDNAを、昆虫細胞Sf9に、Cellfectin Reagent (Gibco-BRL社製)を用いて導入しその培養上清から組み換えバキュロウイルスを得た。こうして得られた組み換えバキュロウイルスを発現効率のよい昆虫細胞High Five感染させて培養2日後、培養上清を回収した。

【0040】(2) エオタキシン3タンパク質の精製
組み換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞の培養上清を0.22μmのフィルターでろ過滅菌し、緩衝液A(50m*

nc7.ex1 SalI 5'-GCGTCGACAGCATCATGATGGGCTCTCCTTG-3' (配列番号8)

実施例3の(1)のエオタキシン3 cDNAのORFを組み込んだプラスミドを鋳型にnc7.ex1 SalI (配列番号8)とnc7.ex3 XbaI (配列番号7)を用いてPCRにより増幅し、制限酵素SalIとXbaIで消化した。

【0042】一方、pBluescript KSベクターにMCP-1-Flag融合タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだプラスミド(Yoshida et al., J.Biol.Chem. 272: 13803-13809, 1997)を制限酵素SalIとXbaIで消化してMCP-1遺伝子を切り出し、代りに上記のPCR産物を組み込んでeotaxin3-Flagを融合タンパク質をコードする遺伝子を構築した(pBS-eotaxin3-Flag)。pBS-eotaxin3-Flagを制限酵素SalIとNotIで消化し、eotaxin3-Flag遺伝子を切り出し、図5のAに示すように、pDREF-Hyg (Imai et al., J.Biol.Chem. 271: 21514-21521, 1996)のSalIとNotIサイトの間に導入して、pDREF-eotaxin3-Flagを作製した。pDREF-eotaxin3-Flagベクターを293/EBNA-1細胞(Invitrogen社製)にLipofectamin (GIBCO-BRL社製)を用

*M MES pH6.5)で一晩透析後、イオン交換カラムHiTrap SP陽イオン交換カラム(pharmacia社製)にアブライし、緩衝液Aで洗浄後、緩衝液B(50mM MES pH6.5, 1M NaCl)によるグラディエントによりタンパク質を溶出させた。エオタキシン3を含むフラクションはSDS-PAGEを用いて同定し、0.7-0.8M NaCl溶出画分に12kDのタンパク質を見出すことができた。この画分をコスモシル逆相カラム5C4-AR300(ナカライテスク社製)にアブライし、溶液C(0.05%TFA)で洗浄後、溶液D(アセトニトリル, 0.05% TFA)によるグラディエントをもちいた逆相クロマトグラフィーによって精製を行なった。エオタキシン3タンパク質はアセトニトリル約30%の位置の単一ピークとして同定でき、SDS-PAGE後の銀染色によりほぼ単一バンドのエオタキシン3タンパク質を得ることに成功した。精製エオタキシン3タンパク質は凍結乾燥後、エンドトキシンフリーの蒸留水(扶桑薬品株式会社製)に溶解し、ケモカインレセプターの細胞内カルシウムの変化を測定した。

【0041】実施例4

20 eotaxin3-Flagタンパク質の調製

エオタキシン3遺伝子が分泌タンパク質をコードしているか、また分泌型成熟エオタキシン3タンパク質のアミノ末端を決定する目的で、エオタキシン3のカルボキシル末端にFlagペプチドを融合した融合タンパク質を調製した。Flagペプチドは抗Flagペプチド抗体を用いた免疫学的方法で検出ができ、また抗Flagペプチド抗体カラムにより融合タンパク質の精製ができる。エオタキシン3とFlagペプチドとの融合タンパク質を発現するためのベクターpDREF-エオタキシン3-Flagを図5のAに示す。pDREF-エオタキシン3-Flagの作製はつぎのように行った。まず、エオタキシン3タンパク質発現ベクター構築用のプライマーを合成した。

※いて導入した。培養3~4日後、培養上清を回収し、0.22 mmのボアサイズのフィルターを通した。

【0043】試験例1

ヒトeotaxin3-Flag融合タンパク質の同定

40 産生されたヒトeotaxin3-Flag融合タンパク質の発現確認を抗Flagペプチド抗体を用いて行った。pDREF-eotaxin3-Flagベクターを組み込んだ293/EBNA-1細胞の培養上清と組み込んでいない293/EBNA-1細胞の培養上清10ulを15/25マルチゲル(第一化学薬品社製)を用いてSDS-PAGEを行った。電気泳動後のゲルをPVDF膜、ImmobilonTM-P (MILLIPORE社製)にトランスファーした。トランスファーしたPVDF膜をブロックエースTM(雪印乳業社製)で4°C、overnightでブロッキングした後、PBS/0.5% Tween 20で5分間を室温で2回洗浄し、1次抗体のAnti-FLAG M2モノクローナル抗体(Kodak社製)を最終濃度5ug/mlでPBS/0.5% Tween 20/10% ブロックエースに溶かしたもので室温2時間インキュベートした。PBS/0.5% T

17

ween 20で5分間を室温で2回洗浄し、2次抗体であるHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (ORGANON TEKNIKA 社製) を最終濃度183 ug/mlになるようにPBS/0.5% Tween 20/10% ブロックエースに溶かし、室温で1時間インキュベートした。PVDF膜をPBS/0.5% Tween 20で5分間を室温で2回洗浄した後、ECLウェスタンブロッティング検出試薬 (アマシャム社製) でeotaxin3-Flagのタンパク質を検出した。その結果、pDREF-eotaxin3-Flagベクターを組み込んだ293/EBNA-1細胞の培養上清のみ分子量約14kDaのeotaxin3-Flagのタンパク質を検出することができた。以上から、エオタキシン3遺伝子は分泌型のタンパク質となることが確認できた。

【0044】試験例2

eotaxin3-Flagの精製とN末端の決定

成熟型のエオタキシン3のN末端のアミノ酸シーケンスを調べるためにeotaxin3-Flagのタンパク質を精製した。293/EBNA-1細胞で発現させたeotaxin3-Flagの培養上清を150ml回収し、0.45umのフィルターでろ過し、最終濃度50mM Tris-HCl (pH7.4) になるように調製し、A緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.4)/150mM NaCl) で平衡化した1ml容量の抗Flagペプチド抗体カラムAnti-FLAG M2 Affinity Gel (Kodak社製) にアブライした。このeotaxin3-Flag融合タンパクの結合したカラムをA緩衝液で洗浄後、あらかじめ試験管に1M Tris-HCl (pH8.0) を10 ul入れておき、そこに溶出液C (0.1 M Glycine-HCl pH3.5) により500ulずつ溶出した。eotaxin3-Flag融合タンパクを含むフラクションはSDS-PAGEを用いて同定した。この精製eotaxin3-Flag融合タンパクのN末端アミノ酸配列は、アミノ酸シーケンサー (島津社製) を用いて決定すると、TRGSであった。このアミノ酸配列は、図1に示した塩基配列から推定されるアミノ酸配列のうち、推定されるシグナル配列の切断部位である23位のアラニン残基と24位のスレオニン残基の間でシグナルペプチドが切断され、71個のアミノ酸からなる成熟型分泌エオタキシン3タンパク質となったときに予想されるN末端アミノ酸配列と完全に一致した。

【0045】試験例3

エオタキシン3タンパク質のケモカインレセプターへの反応試験

実施例3で得られたエオタキシン3タンパク質を用いて恒常的にケモカインレセプターCCR3 (Kitaura et al., J. Biol. Chem. 271: 7725-7730, 1996) に対する反応性を調べた。ケモカインはレセプターと反応すると細胞内のカルシウム濃度を上昇させることが知られている。そこで、マウスpre B細胞株 L1.2に恒常的にケモカインレセプターCCR3を発現させた細胞株L1.2 CCR3を用いてエオタキシン3がCCR3に対して上記のような活性を示すかどうか調べた。L1.2 CCR3、5x10⁶個をPBS(-)で洗浄後、緩衝液C (HBSS (GIBCO社製) /10mM HEPES (pH7.4) /1mg/ml BSA) を2mlで懸濁し、最終濃度3uM Fura2 AM (モレ

18

キュラー・プローブ社製) で37℃、1時間、インキュベートした。細胞を緩衝液Cで洗浄後、緩衝液C 2mlに懸濁した。細胞懸濁液を蛍光光度計 (LS50B, PERKIN ELMER 社製) 励起波長340nm及び380nm、蛍光波長510nm、レスポンス0.2秒で測定した。その結果を340nmと380nmとの蛍光強度の比で図6に示す。エオタキシン3タンパク質を測定開始60秒後にセルに加えた。エオタキシン3タンパク質は1nMからL1.2 CCR3発現細胞に対して反応し、100nMで飽和状態になった。以上から、エオタキシン3はケモカインレセプターCCR3のリガンドであるケモカインであることを同定した。

【0046】試験例4

エオタキシン3タンパク質の各種ケモカインレセプターとの結合阻害作用

マウスpre B細胞株L1.2細胞にケモカインレセプターCCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR5をそれぞれ恒常的に発現させた細胞株 (T. Imai, et al.; J. Biol. Chem. Vol. 273, 1764-1768) を用いて、エオタキシン3との結合実験を行った。200ulの結合緩衝液 A (RPMI 1640, 20mM Hepes (pH7.4), 1% BSA, 0.02% azide) 中にL1.2 CCR1細胞を5x10⁵個、最終濃度0.1nMの¹²⁵I-MIP-1α (アマシャム社製)、非標識のケモカインを最終濃度0から1000nM加え、16℃で1時間インキュベートしたあと、新しい1.5 ml チューブでフタル酸ジ-n-ブチルとオリブ油の80:20の混合液300ulの上に反応液200ulを重ねし、12,000 rpm 90秒遠心後、デカンテーションで上清を捨て、沈澱物を含むチューブの底を切り、切り取ったチューブの底をガンマーカウンターで測定した。ガンマーカウンターの測定値をリガンドの結合活性とした。L1.2 CCR2b細胞は5x10⁵個で0.1nM ¹²⁵I-MCP-1 (アマシャム社製) で、L1.2 CCR5細胞は2x10⁶個で0.5nMの¹²⁵I-MIP-1α (アマシャム社製) で行った。L1.2 CCR3細胞は1x10⁶個で、0.1nM ¹²⁵I-エオタキシン (アマシャム社製) で結合緩衝液 A の代りに結合緩衝液 B (25mM Hepes (pH7.6), 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 0.5% BSA, 120mM NaCl) を用いた。L1.2 CCR4細胞においては、2x10⁵個で1nMのTARC-SEAPで (T. Imai, et al.; Vol. 272, 15036-15042, J. Biol. Chem) で行った。得られた結果を図7および図8に示す。エオタキシン3はケモカインレセプターCCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR5のリガンドの結合に対して結合阻害活性を有していることを確認できた。以上から、エオタキシン3はCCR3に対してはアゴニスト、CCR1、CCR2b、CCR4、CCR5に対してはアンタゴニストとして働く得る。

【0047】試験例5

各種ケモカインレセプターとエオタキシン3との反応性マウスpre B細胞株L1.2細胞にケモカインレセプターCCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR5をそれぞれ恒常的に発現させた細胞株 (T. Imai, et al.; J. Biol. Chem. Vol. 273, 1764-1768) を用いて、エオタキシン3とケモカイン

レセプターとの反応性を細胞内カルシウム濃度の変化で調べた。各細胞を5X10⁶個をPBS(-)で洗浄後、緩衝液C (HBSS (GIBCO社製)/10mM HEPES (pH7.4)/1mg/ml BSA) を2mlで懸濁し、最終濃度3 μ M Fura2 AM(モレキュラー・プローブ社製)で37℃、1時間、インキュベートした。細胞を緩衝液Cで洗浄後、緩衝液C 2mlに懸濁した。細胞懸濁液を蛍光光度計 (LS50B, PERKIN ELMER社製) 励起波長340nm及び380nm、蛍光波長510nm、レスポンス0.2秒で測定した。その結果を340nmと380nmとの蛍光強度の比で示す。最終濃度100 nMのエオタキシン3蛋白を測定開始30秒後にセルに加えた。測定開始90秒後にそれぞれのケモカインレセプターのリガンドであるケモカインを最終濃度10 nMになるように加えた。得られた結果を図9及び図10に示す。エオタキシン3はケモカインレセプターCCR3にのみ反応し、また、CCR1、CCR2 b、CCR4、CCR5はそれぞれのレセプターのリガンドには反応したにもかかわらず、エオタキシン3に反応しなかった。以上から、エオタキシン3はCCR3のリガンドであることがわかった。

【0048】

【発明の効果】白血球の遊走と組織への浸潤を誘導するケモカインは生体内での炎症反応や免疫反応にとって必須の物質である。ケモカインには現在、主にC型、CXXXC型、CXC型とCC型が知られており、それぞれに複数の種類が存在し、産生組織、産生細胞、産生を誘導する刺激の種類、産生誘導から産生停止に到る反応時間、遊走を誘導する標的細胞の種類、特異的レセプターの存在、などに関し相互に異なる性質を示す。本発明エオタキシン3は構造的にはCC型ケモカインのグループに属し、どの組織においても低レベルの発現がみられるが、アレルギーに関係している好酸球、好塩基球で発現しているCCR3に反応するという性質を示す。血中に流れる好酸球はアレルギー性疾患、特に喘息およびアトピー性皮膚炎において、病変部へ浸潤し、その浸潤にはエオタキシン3のようなケモカインが関与していると考えられる。病変部に浸潤した好酸球は主要塩基性タンパク質 (MBP) または好酸球陽イオンタンパク質 (ECP) を放出し、組織を破壊して病状を重篤化する。また、CCR3はAIDSの原因ウイルスであるHIV-1がヒトの細胞に感染するのに必要であることが知られている。CCR3のリガンドの一つであるエオタキシンはHIV-1の感染を阻害することが知られており、エオタキシン3も抗HIV活性を持つことが期待される。

【0049】本発明のエオタキシン3はCCR3を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させる活性を有するため、CCR3を発現している好酸球、好塩基球が関与するアレルギー性疾患の治療薬、ならびに抗HIV薬の検索に用いられ *

*得る。また、ケモカインの活性は、N末端のアミノ酸残基からシステイン残基までの部分のアミノ酸を順次欠失させることにより変化することが明らかになっている。したがって、本発明のエオタキシン3ペプチドの部分ペプチドはエオタキシン3ペプチドの阻害剤となりうることを期待される。このようなペプチドはエオタキシン3ペプチドの阻害剤として、すなわちアレルギー性疾患の治療薬、抗HIV薬として用いられ得る。また本発明によって提供されるエオタキシン3を全長あるいは部分的にコードするポリヌクレオチド分子 (DNAあるいはRNA、2本鎖あるいは1本鎖) は、適当な方法によりそのままポリヌクレオチド分子として生体内に投与したり、適当なベクターに導入して生体外で細胞に導入してその細胞 (形質転換細胞) を体内に戻したり、あるいは適当なベクターに導入して直接体内に投与したりしうる。それによって、目的とする組織や細胞でのエオタキシン3タンパク質の産生を増強したり抑制したりすることが可能となり、アレルギー性疾患、癌、ウイルスやその他の微生物による感染症、エオタキシン3遺伝子の構造や発現の異常をとまなう疾患、などへの治療法に有用である。また、本発明によって提供されるエオタキシン3の塩基配列、エオタキシン3を全長あるいは部分的にコードするポリヌクレオチド分子 (DNAあるいはRNA)、エオタキシン3に対する特異的抗体は、エオタキシン3の遺伝子変異を検出し解析するのに有用であり、またエオタキシン3の遺伝子発現 (mRNA) やタンパク質の発現を特異的に検出し定量することに有用である。それによってエオタキシン3遺伝子やエオタキシン3タンパク質の関与する血液系疾患、免疫系疾患、感染症、癌、などの診断や原因究明にあつたな手段を提供し、またそのような疾患の診断および治療にあつたな手段を提供することが期待される。

【0050】

【配列表】

【0051】配列番号：1

配列の長さ：467

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：28..309

特徴を決定した方法：S

CCTGAGAAGG GCCTGATTG CAGCATC ATG ATG GGC CTC TCC TTG GCC TCT

Met Met Gly Leu Ser Leu Ala Ser

(12)

特開平11-243960

21 22
 GCT GTG CTC CTG GCC TCC CTC CTG AGT CTC CAC CTT GGA ACT GCC ACA 99
 Ala Val Leu Leu Ala Ser Leu Leu Ser Leu His Leu Gly Thr Ala Thr
 10 15 20
 CGT GGG AGT GAC ATA TCC AAG ACC TGC TGC TTC CAA TAC AGC CAC AAG 147
 Arg Gly Ser Asp Ile Ser Lys Thr Cys Cys Phe Gln Tyr Ser His Lys
 25 30 35 40
 CCC CTT CCC TGG ACC TGG GTG CGA AGC TAT GAA TTC ACC AGT AAC AGC 195
 Pro Leu Pro Trp Thr Trp Val Arg Ser Tyr Glu Phe Thr Ser Asn Ser
 45 50 55
 TGC TCC CAG CGG GCT GTG ATA TTC ACT ACC AAA AGA GGC AAG AAA GTC 243
 Cys Ser Gln Arg Ala Val Ile Phe Thr Thr Lys Arg Gly Lys Lys Val
 60 65 70
 TGT ACC CAT CCA AGG AAA AAA TGG GTG CAA AAA TAC ATT TCT TTA CTG 291
 Cys Thr His Pro Arg Lys Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Leu Leu
 75 80 85
 AAA ACT CCG AAA CAA TTG TGA CTCAGCTGAA TTGTCATCCG AGGACGCTTG 342
 Lys Thr Pro Lys Gln Leu
 90
 GACCCCGCTC TTGGCTCTGC AGCCCTCTGG GGAGCCTGCG GAATCTTTTC TGAAGGCTAC 402
 ATGGACCCGC TGGGGAGGAG AGGGTGTTC CTCCCAGAGT TACTTTAATA AAGGTTGTTC 462
 ATAGT 467

【0052】配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

AAGGGCCTGA TTTGCAGCAT C

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

21

【0053】配列番号3

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列

AAAGATTCCG CAGGCTCCCC AGAGG

25

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0054】配列番号4

配列の長さ：32

配列の型：核酸

配列

CATATCCAAG ACCTGCTGCT TCCAATACAG CC

32

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0055】配列番号5

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列

TTCCCTGGAC CTGGGTGCGA AGCTA

25

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0056】配列番号6

配列の長さ：32

配列の型：核酸

配列

CTTCAGAAAA GATTCCGAG GCTCCCCAGA G

31

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0057】配列番号7

配列の長さ：36

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 50 配列の種類：他の核酸 合成DNA

23

24

配列

GCTCTAGACA ATTGTTTCGG AGTTCCTCAGT AAAGAA

36

【0058】配列番号8

配列の長さ: 32

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACAG CATCATGATG GGCCTCTCCT TG

32

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトエオタキシン3のcDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す。

【図2】 本発明のエオタキシン3タンパク質と、既知の20種のヒトCC型ケモカインとのアミノ酸配列の比較を示す。

【図3】 本発明のエオタキシン3タンパク質と、既知の20種のヒトCC型ケモカインとのアミノ酸配列の比較を示す。

【図4】 各種のヒト組織におけるエオタキシン3のmRNAの発現をPCR法(A)とノーザンブロットにより解析した結果(B)を示す図面に代わる写真である。

【図5】 組換えベクターpDREF-eotaxin3-Flagの遺伝 ※20

※子地図(A)と発現させたeotaxin3-Flag融合タンパク質の検出結果を示す図面に代わる写真(B)である。

10 【図6】 エオタキシン3タンパク質によるL1.2 CCR3発現細胞株の細胞内カルシウム濃度の変化を示すグラフである。

【図7】 エオタキシン3タンパク質の各種ケモカインレセプターに対する結合性を示すグラフである。

【図8】 エオタキシン3タンパク質の各種ケモカインレセプターに対する結合性を示すグラフである。

【図9】 エオタキシン3タンパク質の各種ケモカインレセプターに対する反応性を示すグラフである。

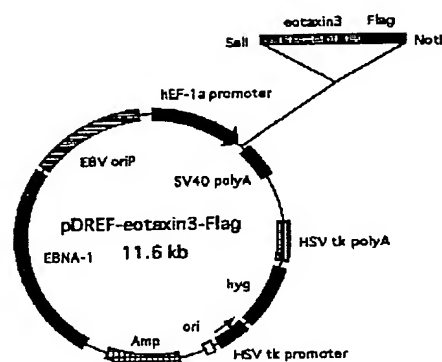
【図10】 エオタキシン3タンパク質の各種ケモカインレセプターに対する反応性を示すグラフである。

【図1】

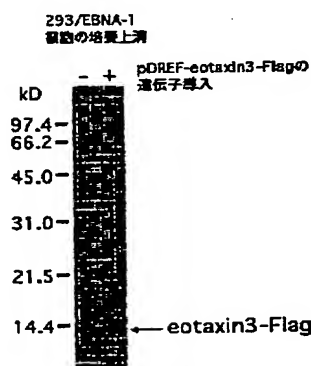
1	CCTCAGAAGGGCCTGATTTCAGCATCATGAGGCGCTCTGCTGGCCTCTGCTGTGCTC	60
1	M M G L S L A S A V L	11
61	CTGGCCTCCCTCCTGAGTCTCCACCTTGGAACTGCCACACGCTGGAGTGACATATCCAAG	120
12	L A S L L S L H L G T A T R G S D I S K	31
121	ACCTGCTGCTTCCAATACAGCCACAAGCCCTTCCCTGGACCTGGTGCCGAAGCTATGAA	180
32	T C C F Q Y S H K P L P W T M V R S Y E	51
181	TYCACAGTAACAGCTGCTCCAGCGGGCTGTGATATTCACACAAAGAGGCAAGAAA	240
52	F T S N S C S Q R A V I F T T K R G K K	71
241	GTCTGTACCCATCCAAGGAAAAATGGGTGCAAAAATACATTTCTTTACTGAAAACCTCG	300
72	Y C T H P R K K M V Q K Y I S L L K T P	91
301	AAACAATTGTGACTCAGCTGAATTGTCATCCGAGGACGCTTGGACCCCGCTCTTGCTCT	360
92	K Q L *	94
361	GCAGCCCTCTGGGAGCCTCGGAATCTTTCTGAAGGCTACATGGACCCGCTGGGGAGG	420
421	AGAGGGTGTCTCTCCACAGTTACTTTAATAAAGGTTGTTTCATAGT	467

【図5】

A



B



【図2】

	1	10	20	30	40	50	60	70
1433	MMGLSLASA	--VLLASLLSLHGTATRGSDIS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1434	MKVSAAILL	--WLLIAAFSPOGLAGP	--ASVP	-----	-----	-----	-----	-----
1435	MAGLMTIV	--TSLFLGVCAHHI	IP	PTGSYVIP	-----	-----	-----	-----
MCP-1	MKVSAAILL	--CLLLIAATFIPOGLAQDA	INAP	-----	-----	-----	-----	-----
MCP-2	MKVSAAILL	--CLLLMAATFSPOGLAQDPSYS	IP	-----	-----	-----	-----	-----
MCP-3	MMKMPSPSNMKASAAILL	--CLLLTAAAFSPOGLAQDVGINTS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MCP-4	MKVSAILL	--CLLLMTAAFNPOGLAQDALNWP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MIP-1 α	MOVSTAAL	--AVLLCTMALCNQFSASLAADTP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MIP-1 β	MKLCVTYL	--SLLMLVAAFCSPALAPMGSDPP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RANTES	MKVSAAILL	--AVILIALCAPASASPYSSDT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TARC	MAPLKMLA	--LVTLLEGASLOHIAARGTNVG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MDC	MARLQTALLVVLVLLAVALOATEAGPYGANMED	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LARC	MCCTKSLL	--LAALMSVLLHLCOESEASIN	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ELC	MALLALS	-----	LLVLMTSPAPTLSTGND	-----	-----	-----	-----	-----
SLC	MAQSLALS	--LLVLVLAFG	-----	IPRTQSDGG	-----	-----	-----	-----
HCC-1	MKISVAAIPFELL	ITIALGKTSSSRGPYHP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-309	MOIITTAAL	--VCLLAGMNPEDVDISK	SMOVP	-----	-----	-----	-----	-----
TECK	MNLWLLAC	-----	LVAGFLG	AWAPAVHTQGVF	-----	-----	-----	-----
PARC	MKGLAAL	--LVLVCTMALC	-----	SCAOGVTNK	-----	-----	-----	-----
MPIF-1	MKVSVAAL	--SCLMLVTALGSOARVTKDAETEMASKLPLENPVLLDRFHATSADCCISYTPRS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CC-2	MKVSVAAL	--SCLMLVAVLGSOAQFTINDAETELMASKLPLENPVLLNSHFHA	ADCCISYISQS	-----	-----	-----	-----	-----

*

**

図3に続く

【図3】

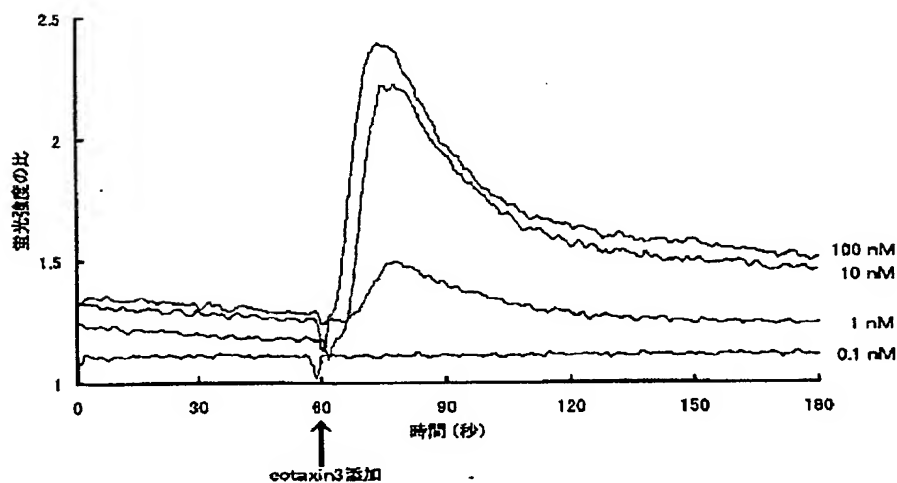
図2から続く

	80	90	相同性(%)
エタキシ3	--KVCTHPRKKWVQKYISLLKTPKQL--		100
エタキシ	--DICADPKKKWQDSMKYLDQKSPTPKP--		31
エタキシ2	--QFCGDPKQEWVQRYMKNLDAKQKKASPRARAVAVKGPVQRYPGNQTTTC--		32
MCP-1	--EICADPKQKWQDSMDHLDKQTQTPKT--		25
MCP-2	--EVCADPKERWVRDSMKHLDQIFONLKP--		29
MCP-3	--EICADPTQKWQDFMKHLDKKTOTPKL--		31
MCP-4	--EICADPKEKWQNYMKHLGRKAHTLKT--		29
MIP-1 α	--QVCADPSEEWVQKYVSDLELSA--		35
MIP-1 β	--QVCADPSESWQYVYDLELN--		36
RANTES	--QVCANPEKKWVREYINSLEMS--		34
TARC	--AICSDPNKRVKNAVKYQSLERS--		27
MDC	--EICADPRVPWVKMILNKLSQ--		27
LARC	--SVCANPKQTVWKYIVRLLSKKVKNM--		17
ELC	--QLCAPPDQPVVERIQRLORTSAKMKRRSS--		23
SLC	QAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRCRKGASKTGKKGKSGKGRTERSQTPKGP--		22
HCC-1	--SVCTNPSDKWVDYIKDMKEN--		31
I-309	--EACALDTVGWVQRHRKMLRHCPKSRK--		21
TECK	R-KVCGNPKSREVQRAMKLLDARNKVFAKLHHNQTFQAGPHAVKKLSSGNSKLSSSKFSNPISSSKRNVSLLISANSGL		21
PARC	--QICADPNKKWQKYISDLKLNA--		34
MP1F-1	--RFCANPSDKQVQVCMPLKLDTRI KTRKN--		25
CC-2	--QVCAKPSGPGVQDCMKLKPYSI--		29

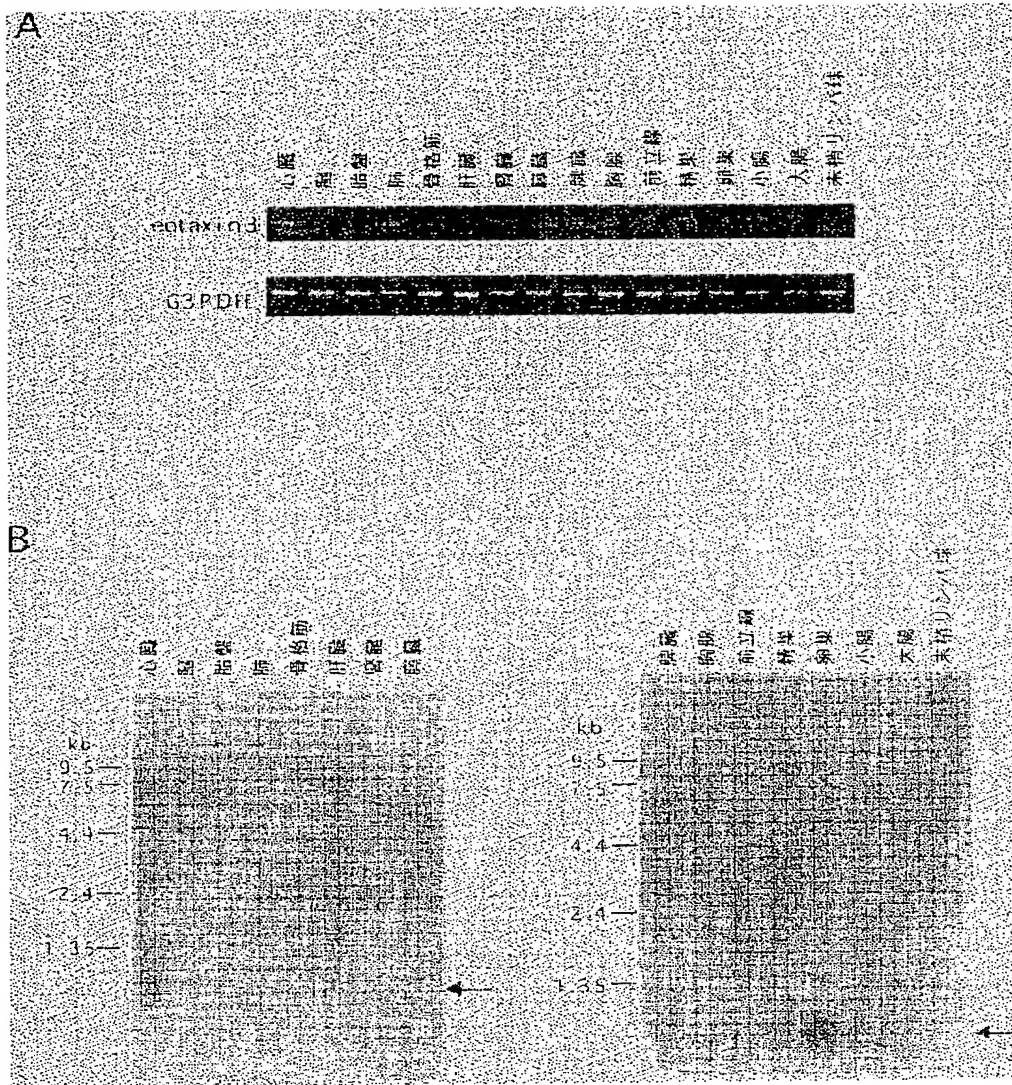
* *

【図6】

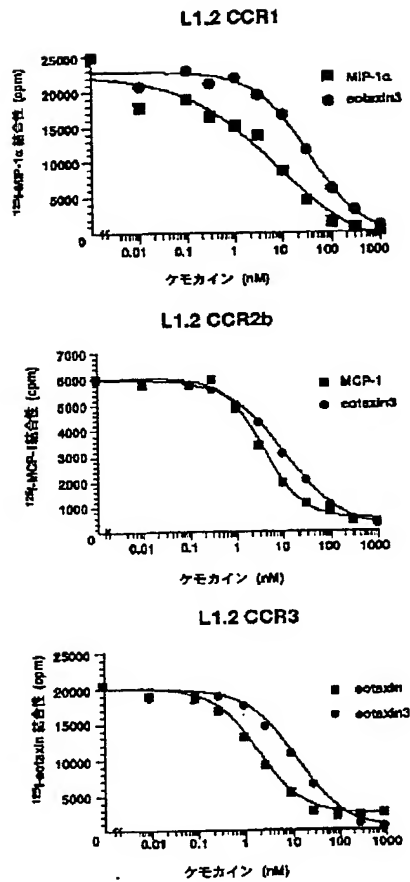
L1.2 CCR3発現細胞株における細胞内カルシウム濃度の変化



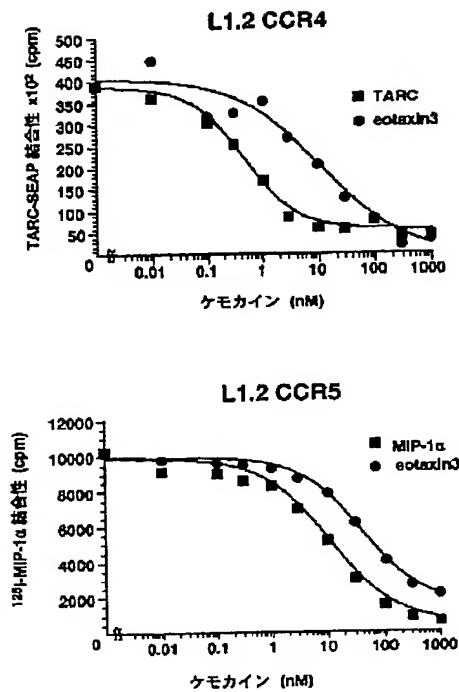
【図4】



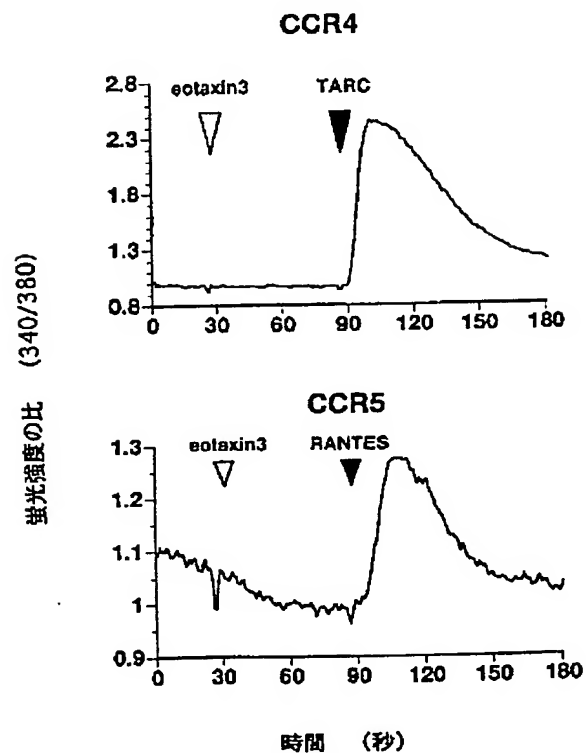
【図7】



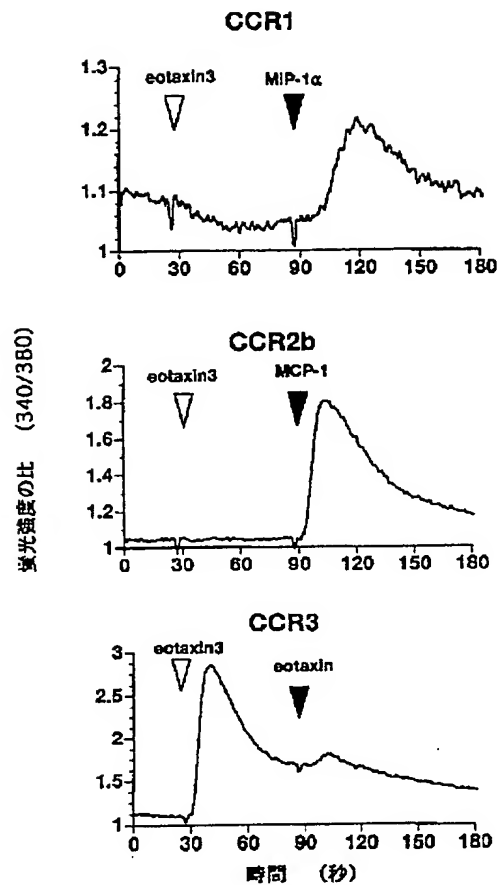
【図8】



【図10】



【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 K 14/47		G 0 1 N 33/53	D
16/18		33/577	B
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C
15/02		21/08	
G 0 1 N 33/15		A 6 1 K 37/02	ABF
33/53			ADU
33/577			ADY
// C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 5/00	B
21/08		15/00	C
(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 N 5/10			
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/08			

(19)

特開平11-243960

C12R 1:91)